

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 926 240 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
30.06.1999 Patentblatt 1999/26

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/53**, C12N 9/02,
C12P 41/00

(21) Anmeldenummer: 98122231.8

(22) Anmeldetag: 23.11.1998

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 03.12.1997 DE 19753350

(71) Anmelder:
Degussa-Höls Aktiengesellschaft
45764 Marl (DE)

(72) Erfinder:
• Kula, Maria-Regina Prof.Dr.
52382 Niederzier (DE)
• Pohl, Martina Dr.
52066 Aachen (DE)
• Slusarczyk, Heike Dr.
52531 Übach-Palenberg (DE)

(54) **Mutanten der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*, Gensequenzen diese codierend sowie Verwendung dieser Formiatdehydrogenasen**

(57) Die Erfindung richtet sich auf neue Mutanten der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*, neue Gensequenzen diese codierend sowie Verwendung der neuen Formiatdehydrogenasen.

Die bisher im technischen Prozess zur Herstellung von Aminosäuren eingesetzte Wildtyp-FDH inaktiviert nach einer gewissen Zeit. Durch gerichtete Mutagenese einer rekombinanten FDH aus *E. coli* wurden neue Mutanten dieses Wildtyps erzeugt. Die neuen Mutanten werden bevorzugt in einem enzymatischen Verfahren zur Herstellung von chiralen Verbindungen eingesetzt.

EP 0 926 240 A2

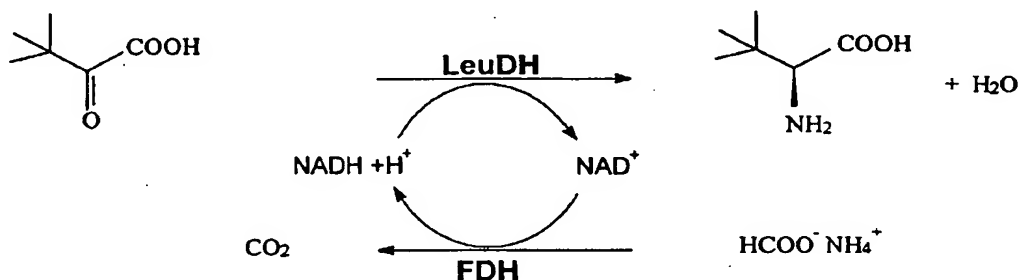
Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung richtet sich auf Mutanten der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (DSM 32195). Weiterhin betrifft die Erfindung neue Gensequenzen, welche diese Mutanten codieren, sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen Formiatdehydrogenasen in einem Verfahren zur Herstellung chiraler Verbindungen.

[0002] Zur Herstellung von L-Aminosäuren werden u. a. erfolgreich Biokatalysatoren eingesetzt. Ein Ansatz geht dabei von der Umwandlung prochiraler α -Ketosäuren durch reduktive Aminierung aus. Die dabei benutzten Aminosäuredehydrogenasen benötigen zur Umsetzung der α -Ketosäuren stöchiometrische Mengen an NADH bzw. NADPH als Coenzym. Diese Coenzyme sind sehr teuer und machen dadurch das o. g. Verfahren für den industriellen Maßstab wirtschaftlich uninteressant.

[0003] Eine Möglichkeit, hohe Kosten durch das Coenzym zu vermeiden, besteht darin, das Coenzym *in situ* zu regenerieren. Im technischen Maßstab wird derzeit u. a. die NAD-abhängige Formiatdehydrogenase aus der Hefe *Candida boidinii* im Enzymreaktor zur Coenzymregeneration eingesetzt.

Schema 1:



[0004] *In situ* Regeneration von NADH mit der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase bei der reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat zu L-tert-Leucin (Bommarius et al. Tetrahedron Asymmetry 1995, 6, 2851-2888).

[0005] Ein Nachteil, den der Einsatz der FDH aus *Candida boidinii* im Produktionsprozeß mit sich bringt, ist die Notwendigkeit, FDH während des Prozesses nachdosieren zu müssen, da sie aufgrund fehlender Stabilität inaktiviert. Diese Inaktivierung kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden:

- pH-Wert
- Temperatur
- mechanische Belastung
- Ionenstärke und Ionenart der Substratlösung
- Spuren von Schwermetallen
- Oxidation von Sulfhydrylgruppen durch Luftsauerstoff
- Vernetzung durch Thiol-Disulfidaustausch

[0006] Tishkov et al. zeigten, daß mittels gerichteter Mutation der rekombinanten FDH aus *Pseudomonas sp.* deren Stabilität gegenüber Quecksilbersalzen erhöht wird, wohingegen die thermische Stabilität jedoch durch die Mutagenese erniedrigt wurde (Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993, 192, 976-981).

[0007] Sakai et al. klärten die Gensequenz der FDH aus der methylotrophen Hefe *Candida boidinii* auf (J. Bacteriol. 1997, 179, 4480-4485), die abgeleitete Proteinsequenz stimmt zu 100 % mit der Aminosäuresequenz der in dieser Arbeit zugrundegelegten rekombinanten FDH aus *Candida boidinii* überein (Sequenzprotokoll 1).

[0008] Angesichts des hierin angegebenen und diskutierten Standes der Technik war es mithin Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die im technischen Prozeß eingesetzte FDH aus *Candida boidinii* derart abzuwandeln, daß diese verglichen mit der rekombinanten FDH und dem Wildtyp gegenüber der Oxidation eine größere Stabilität aufweist und so ein kostspieliges und kompliziertes Nachdosieren der FDH während des Prozesses überflüssig macht.

[0009] Diese und nicht näher genannte weitere Aufgaben werden durch die neuen Mutanten des Anspruchs 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Mutanten werden in den Ansprüchen 2 und 3 unter Schutz gestellt. Auf die diese vorteilhaften Aminosäuresequenzen codierenden Gene richtet sich der Anspruch 4. Anspruch 5 enthält eine erfindungsgemäße Verwendung der mutierten FDHs.

[0010] Dadurch, daß man die rekombinante Formiatdehydrog nase aus *Candida boidinii* mittels gerichteter Mutagenese abwandelt, gelingt es sehr vorteilhaft und dennoch überraschend, gegenüber der rec-FDH und dem Wildtypenzym aggregations- und oxidationsunempfindlicher Mutanten zu generieren und so eine größere Standzeit dieser Enzyme im Produktionsprozeß herbeizuführen. Überraschenderweise werden dabei andere vorteilhafte Eigenschaften der FDH, wie z. B. katalytische Aktivität, Konformationsstabilität, Thermostabilität, etc., nur marginal beeinflußt, so daß der neue Vorteil durch andere hinzukommende Nachteile nicht negiert wird. Dies war keineswegs vorhersehbar, da in einem so komplexen Molekül häufig schon die kleinste Änderung zum vollständigen Verlust der Aktivität des Enzyms führt.

[0011] Bevorzugt wandelt man die betrachtete rekombinante Formiatdehydrogenase so ab, daß die schwefelhaltigen Aminosäuren des Enzyms unabhängig voneinander, einzeln oder zusammen gegen nicht schwefelhaltige Aminosäuren ausgetauscht werden.

Als ganz besonders bevorzugte Targets zur gerichteten Mutation erscheinen die Cysteine an den Positionen 23 und 262 der FDH. Dabei kann die gerichtete Mutagenese entweder nur an einer dieser Stellen oder an beiden geschehen. Vorteilhafterweise wird die schwefelhaltige Aminosäure der Position 23 und/oder 262 unabhängig voneinander, einzeln oder zusammen gegen Aminosäuren ohne Sulfhydrylrest ausgetauscht. Besonders bevorzugt ist ein Austausch gegen Serin, Alanin oder Valin.

[0012] Der Erfolg dieser Abwandlung war zum Zeitpunkt der Erfindungsfindung aus oben genanntem Grund weder vorhersehbar noch naheliegend.

[0013] Die durch die neuen Gensequenzen codierten Enzyme mit verbesserter Stabilität finden bevorzugt Anwendung in einem enzymatischen Verfahren zur Herstellung von chiralen Verbindungen u. a. der eingangs erwähnten Art.

[0014] Die erfindungsgemäßen Enzyme mit Formiatdehydrogenaseaktivität lassen sich vorteilhafterweise auf der Basis des rekombinanten FDH-Gens mittels gerichteter Mutagenese erzeugen und in *E. coli* exprimieren. Das Arbeiten mit rekombinanter FDH bietet den Vorteil, daß eine einheitliche Gensequenz und damit ein einheitliches Genprodukt vorliegt, in dem Mutationen erzeugt werden können. Um die Auswirkungen der Mutation in der Mutante wirkungsvoll mit dem Wildtypenzym vergleichen zu können, ist es aber von entscheidendem Vorteil, von einem einheitlichen Enzym ausgehen zu können. In *Candida boidinii* selbst liegen wahrscheinlich mehrere Isoformen des Enzyms vor, welche präparativ schlecht zu trennen sind. Auf jeden Fall zeigt das Wildtypenzym auf Proteinebene Mikroheterogenität.

[0015] Darüber hinaus kann man sich aller bezüglich *Escherichia coli* dem Fachmann bekannten Vorteile gegenüber den Ursprungsorganismen, wie z. B. hinsichtlich der Vermehrung oder der Expression, bedienen.

[0016] Die erfindungsgemäßen Gen- und Aminosäuresequenzen lassen sich nach an sich bekannten Methoden der Biochemie und Molekularbiologie herstellen.

[0017] So kann die genomische DNA aus *Candida boidinii* nach Kultivieren, Aufschließen und Fällen gemäß Ferbeyre et al. (Bio Techniques 1993, 14, 386) erhalten werden. Hieraus kann das FDH-Gen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Die notwendigen Primer wurden aus Proteinsequenzdaten abgeleitet. Das erhaltene FDH-Gen wurde in einen Klonierungsvektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Nach Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen mittels eines kommerziell erhältlichen Präparationskits (z.B. Qiagen Plasmid Tip 20), wurden beide DNA-Stänge sequenziert. Die Sequenz ist in Sequenzprotokoll 1 dargestellt.

[0018] Die rekombinante Plasmid-DNA diente ebenfalls als Templat für die PCR-vermittelte Mutagenese nach Ho et al. (Gene, 1989, 77, 52-59). Die verwendeten Primer beinhalten das veränderte Codon (in Klammern) zum Austausch der entsprechenden Aminosäureposition: C23 (TGT Bp 67-69) gegen S23 (TCT); C262 (TGT, Bp 784-786) gegen V262 (GTT) oder A262 (GCT). Die amplifizierten, mutierten FDH-Gene wurden in den Expressionsvektor pBTac2 (Boehringer) (Abb. 1) kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die Muteine wurden durch Aufschluß der kultivierten *E. coli* Zellen in Form eines zellfreien Rohextrakts gewonnen.

[0019] Der Vorteil der neuen Enzyme wird durch Stabilitätsuntersuchungen deutlich. In einer vergleichenden Untersuchung wurde die Inaktivierung der rekombinanten FDH aus *Candida boidinii*, der FDH-C23S, der FDH-C23S/C262A, der FDH-C23S/C262V, der FDH-C262V gemessen und deren Inaktivierungshalbwertszeiten gegenübergestellt. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1

Enzyme	Halbwertszeit (h)
recFDH	<1
FDH-C23S/C262A	>750
FDH-C23S	>750
FDH-C23S/C262V	160

Tab. 1 (fortgesetzt)

Enzyme	Halbwertszeit (h)
FDH-C262V	21

[0020] Eindeutig ist die Verbesserung der Stabilisierung an der Erhöhung der Halbwertszeiten bei den Mutanten FDH-C23S/C262A sowie FDH-C23S und FDH-C23S/C262V zu erkennen. Die Schreibweise FDH-C23S bedeutet, daß bei der betrachteten Formiatdehydrogenase das Cystein (C) an Stelle 23 der Proteinsequenz durch Serin (S) ersetzt wurde. Analog ist der Terminus FDH-C262V, wo Cystein an Position 262 gegen Valin ausgetauscht wurde, zu verstehen.

[0021] Unter rec-FDH ist die rekombinante Formiatdehydrogenase zu verstehen, welche durch Klonierung und Expression des Gens aus *Candida boidinii* in *E. coli* gemäß unten stehender Vorschrift gewonnen werden kann.

[0022] Als Wildtypenzym wird die heterogene FDH, die aus *Candida boidinii* gewonnen werden kann, bezeichnet.

[0023] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung verdeutlichen.

Beispiel 1: Herstellung genomischer DNA aus *Candida boidinii*

[0024] Die präparation genomischer DNA aus der Hefe wurde in einer modifizierten Form nach Ferbeyre et al. (Bio Techniques 1993, 14, 386) durchgeführt. Dazu wurden die *Candida boidinii*-Zellen in 200 ml YEPD-Medium bei 30°C und 200 rpm bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 15°C, 5000 rpm, GSA-Rotor) geerntet. Unter diesen Bedingungen konnten ~ 2.0 g Zellfeuchtmasse / 100ml Kultur erzielt werden. Die Zellen wurden einmal mit 10 mM Citratphosphatpuffer, pH 7.5, gewaschen und anschließend in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Der Zellsuspension wurde 1 mg Protease [Qiagen] und 200 Units Lyticase aus *Arthrobacter luteus* [Sigma] pro ml Lysispuffer zugesetzt. Die Suspension wurde 60 min bei 37°C inkubiert und im Anschluß mit demselben Volumen (Vol.) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) extrahiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei RT und 12000 rpm im SS34 Rotor wurde die wässrige Phase abgenommen und bei Auftreten einer großen Interphase erneut mit PCI extrahiert. Die DNA wurde dann in der wässrigen Phase mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 2 Vol. eiskaltem Ethanol (abs.) gefällt, 5 min auf Eis gestellt, auf einen Glasstab gewickelt und unter der Sterilbank getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA über Nacht in 5 ml TE, pH 7.5, bei 4°C gelöst. Die RNA in der DNA-Präparation wurde durch Zugabe von 100 µg RNaseA / ml Lösung und Inkubation für 60 min bei 37°C unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler (40 rpm) verdaut. Anschließend wurde die RNaseA durch Extraktion mit einem Vol. PCI gefällt und die wässrige Phase einmal mit einem Vol. CI extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Nach Zentrifugation wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 1/10 Vol 3M Natriumacetat pH 5.2 und 0.7 Vol. 2-Propanol bei RT gefällt, auf einen Glasstab gewickelt und wie zuvor getrocknet. Die genomischen DNA (gDNA) wurde über Nacht in 2.5 ml TE, pH 7.5 bei 4°C gelöst.

Die gDNA wurde anschließend in einem 0.5 %-igen Agarosegel hinsichtlich der Größenverteilung analysiert und durch Bestimmung der OD260nm und OD280nm quantifiziert und qualifiziert.

Mit dieser Methode konnte hochmolekulare und für die meisten molekularbiologischen Anwendungen ausreichend saubere genomische DNA in guter Ausbeute (700 µg genomische DNA / g Zellfeuchtmasse) gewonnen werden.

Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer:

[0025]

YEPD-Medium: 1 % (w/v) Hefeextrakt
2 % (w/v) Pepton
2 % (w/v) Glucose

Lysispuffer: 10 mM Citratphosphat pH 7.5
1 M Sorbitol
100 mM EDTA
1 % (w/v) SDS
1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

TE pH 7.5: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
1 mM EDTA

PCI Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1)

CI Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1)

Beispiel 2: Amplifizierung des FDH-Gens mittels PCR ausgehend von genomischer DNA

5 [0026] Alle PCR-Ansätze wurden mit 50 - 100 µl leicht m Mineralöl [Sigma] überschichtet und die PCR wurde mit Hilfe eines automatischen DNA-Thermal-Cyclers [Robocycler, Stratagene] nach folgend m Programm durchgeführt:

PCR-Programm:

10 [0027]

2 min Denaturierung bei 94°C (1x zu Anfang des Programms) 1 min Denaturierung bei 94°C

1.5 min Annealing der Primer bei 46 - 60°C (je nach Schmelztemperatur der Primer)

15

1.5 min Extension bei 72°C (Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase)

zyklische Wiederholung der letzten drei Schritten (25 - 30 x)

20 10 min Extension bei 72°C, um zu gewährleisten, daß alle amplifizierten Fragmente vollständig verlängert werden

[0028] Der PCR-Ansatz enthielt:

25 100 ng gDNA
20 pmol Primer N-TermF3
20 pmol Primer C-TermR5
je 0.2 mM dNTPs
0.5 µl Taq-Polymerase (Boehringer)
10 µl Puffer 10x (Boehringer)
30 ad 100 µl mit A. dest
Annealingtemperatur: 48°C, 35 Zyklen

[0029] Das PCR-Fragment wurde mittels Sure-Clone-Kits (Pharmacia, Freiburg) in den Vektor pUC18 ligiert. Zur Transformation wurde die Methode nach Hanahan (J. Mol. Biol. 1983, 166, 557) angewandt. Dazu wurden 2 µl Ligationsansatz Vektor pUC-FDH zu 100µl kompetenten *E. coli* XL1Blue-Zellen gegeben.

Beispiel 3: Herstellung der Mutante FDH-C23S

40 [0030] Die Punktmutanten der FDH wurden auf der Basis des klonierten FDH-Genis (pUC-FDH) (s. Beisp. 1) nach der Methode von Ho et al. (Gene 1989, 77, 52-59) erzeugt. Dabei wurden folgende "innere" Oligonukleotid-Primer verwendet, die beide die Mutation beinhalten:

- innere Primer zur Einführung der Mutation C23S:

45 S23sense: 5'-TTTTCAGTAGAACCATATAA-3'
S23antisense: 5'-TATATGGTTCCTACTGAAAAT-3'

[0031] Als "äußere" Primer wurden folgende Oligonucleotid-Primer verwendet:

50 PUC181S: 5'-CGCGCGTTTCGGTGATGACG-3'
C-TermR5/PstI: 5'-CTGCAGTTATTCTTATCGTGTTCACCGTA-3'
N-TermF3/EcoRI: 5'-GAATTCATGAAGATTGTCTTAGTCTTTAT-3'

1. Herstellung der einzelnen Fragmente:

55 [0032]

Ansatz A: Herstellung des SER23SI-CTERM5/PstI - Fragments (1.0 kb)

100ng pUC-FDH (1.1 kbFDH-EcoRI/PstI in pUC18)

30 pmol Primer SER23SI

30 pmol Primer CTERM5/PstI

1.5 µl Pfu-Polym. rase (2.5 U/µl)

1/10 Vol Polymerasepuffer 10x

je 0.2 mM dNTP

ad 100 µl mit A. dest.

Annealing-Temperatur: 46°C, 30 Zyklen

Ansatz B: Herstellung des PUC18SI-SER23AS1 - Fragments (500 bp)

100 ng pUC-FDH (s.o.)

30 pmol Primer PUC 18SI

30 pmol Primer SER23ASI

1.5 µl Pfu-Polymerase (s.o.)

1/10 Vol Polymerasepuffer 10x

je 0.2 mM dNTP ad 100 µl mit A. dest.

Annealing-Temperatur: 44°C, 30 Zyklen.

[0033] Nach der PCR wurden die Ansätze in einem präparativem Agarosegel (1 %) aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten, mit Hilfe des Jetsorb-Gelextraction-Kits (Genomed) isoliert, die Konzentrationen in einem analytischen Agarosegel abgeschätzt (Referenz: 1µg kb-Leiter, Gibco) und als Templat in der Fusions-PCR mit überlappenden Fragmenten eingesetzt.

2. Fusions-PCR zur Herstellung des kompletten FDH-C23S Gens (1.1 kb)

[0034]

150 ng SER23S1-CTERM5/PstI-Fragment

90 ng PUC18SI -SER23ASI -Fragment

20 pmol Primer NTERM5/EcoRI

20 pmol Primer CTERM5/PstI

1.5 µl Pfu-Polymerase (2.5 U/µl)

1/10 Vol Polymerasepuffer 10x

je 0.2 mM dNTP

ad 100 µl mit A. dest.

Annealing-T.: 46°C 30 Zyklen

[0035] Der PCR-Ansatz wurde direkt im A-tailing (s.u.) eingesetzt.

3. Klonierung des PCR-Produkts in pMOS-Blue:

[0036] Die Klonierung erfolgte mittels des pMOS Blue T-Vektor-Kits (Amersham)

a) A-Tailing

100 µl Fusions-PCR-Ansatz wurden mit 1 Vol Chloroformisoamylalkohol (CI) (24:1) extrahiert.

25 µl wässrige Phase = 1/4 des PCR-Ansatzes

1.8 µl 10 x Puffer (siehe Protokoll des Amersham)

1.8 µl dNTP-Mix (siehe Protokoll des Amersham)

8.5 µl A-tailing-Puffer (siehe Protokoll des Amersham)

0.5 µl Tth-DNA-Polymerase

ad 85 µl mit A. dest

15 min 70°C

1 x mit CI extrahieren

Nach Isolierung des das FDH-C23S-Gen umfassenden PCR-Fragments mittels Agarosegelelektrophorese

und Isolation des PCR-Fragments mittels Jet-Sorb (Genomed), wurde das Fragment in den Vektor pMOS-Blue ligiert.

Ligation in pMOS-Blue:

- 5 50 ng pMOS-Blue-Vektor
- 120 ng FDH-Ser23 - 3'dA
- 0.5 µl ATP 10 mM
- 1.0 µl Ligase-Puffer
- 0.5 µl DTT 100mM
- 10 0.5 µl T4 DNA-Ligase (2-3 Weiss-Units)
- ad 10 µl mit A.dest

Inkubation über Nacht bei 16°C.

b) Transformation in MOS Blue kompetente Zellen (Nach Amersham Protokoll, 1994)

- 15 1 µl Ligationsansatz
- 20 µl kompetente Zellen
- 40 sec 42°C
- 2 min auf Eis
- 20 80 µl LB-Medium zufügen 1 h 37°C
- 50 µl auf LB mit Ampicillin und Tetracyclin ausplattieren.

4. Klonierung des FDH-C23S-Gens in den Expressionsvektor pBTac2 (Boehringer)

- 25 [0037] Aus den rekombinanten pMOS-Blue-Zellen wurde nach Vermehrung in *E. coli* die Plasmid-DNA (pMOS-FDH-C23S) isoliert und das FDH-C23S-EcoRI/Pst1-Fragment (1.1 kb) mittels Restriktionsverdau präpariert.

Präparativer EcoRI-Pst1-Verdau

- 30 [0038]
- 15 µl Plasmid-DNA (ca. 200 ng) pMOS-FDH-C23S
- 3 µl Puffer H (Boehringer)
- 0.5 µl EcoRI (10U/µl)
- 35 0.5 µl Pst1 (10U/µl)
- 11 µl A. dest.
- 2 h, 37°C

[0039] Das Fragment wurde nach den o.a. Methoden isoliert.

40

Ligation in pBTac2

[0040] 100 ng pBTac2 wurde, wie zuvor beschrieben, mit EcoRI und Pst1 verdaut, und der linearisierte Vektor wurde nach den o.a. Methoden isoliert. In den geöffneten Vektor wurde das FDH-C23S-EcoRI/Pst1-Fragment (1.1 kb) ligiert.

- 45 [0041] Der Ligationsansatz enthielt:

- 45 ng pBTac2-EcoRI/Pst1
- 60 ng FDH-C23S-EcoRI/Pst1
- 1 µl Ligase Puffer 10x (Boehringer)
- 50 0.5 µl T4 DNA-Ligase (Boehringer)
- ad 10 µl mit A. dest
- Über Nacht bei 16°C inkubieren.

5. Transformation in *E. coli* JM 105

55

[0042] Zur Transformation wurden 5 µl Ligationsansatz mit 100 µl kompetenten *E. coli* JM 105-Zellen versetzt und die Transformation nach Hanahan (s.o.) durchgeführt.

Beispiel 4: Expression von FDH-C23S in *E. coli*

[0043] Das rekombinante Wildtyp-FDH-Gen und die FDH-Mutanten wurden im 200 ml-Maßstab in *E. coli* Zellen JM105 exprimiert. 200 ml LB-Medium wurden zur Selektion 100 µg Ampicillin pro ml zugesetzt und im Verhältnis 1:50 mit einer über Nacht inkubierten Vorkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 180 rpm auf einem Reziproschüttler kultiviert und bei einer optischen Dichte (OD_{550nm}) von 0.6 - 0.8 mit 1mM IPTG induziert. Die Expressiondauer betrug zwischen 5.0 h (0.7 g Zellfeuchtmasse) und 20 h (1.25 g Zellfeuchtmasse). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, GSA-Rotor, 10 000 rpm) geerntet.

LB (Luria Bertani)-Medium:

1.0 % Bacto - Trypton

0.5 % Bacto - Hefeextrakt

1.0 % NaCl

mit NaOH auf pH 7.5 einstellen

LBamp-Medium

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

[0044] Der Zellaufschluß erfolgte mechanisch mittels Glasperlen (Durchmesser 0.3 mm). Es wurden 30%-ige *E. coli*-Zellsuspension in Aufschlußpuffer hergestellt, denen die doppelten Gewichtsanteile an Glasperlen zugefügt wurden. Der Aufschluß erfolgte je nach Volumen im 1 - 2 ml-Maßstab in einer Schwingmühle [Retsch; Hummel und Kula (1989) J. Microbiol. Meth. 9, 210], einem SS34-Zentrifugenröhrchen (10-20 ml) auf einem Vortex [IKA] oder in einem Desintegrator S (20 - 50 ml) [IMA] über einem Zeitraum von 20 min. Der Aufschluß wurde 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert, der zellfreie Überstand abgenommen und die Glasperlen und das Zellpellet einmal mit ¼ - ½ Zellsuspensionsvolumen Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die zellfreien Überstände vereinigt. Die Volumenaktivität der FDH-C23S im zellfreien Rohextrakt betrug 10 U/ml.

Aufschlußpuffer: 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5

10 Tropfen Ucolup / L Puffer

Beispiel 5: Bestimmung der Stabilität der FDH-C23S

[0045] Zur Bestimmung der Halbwertszeiten der Deaktivierung wurde der zellfreie Rohextrakt der FDH-C23S verwendet.

[0046] Die Testansätze enthielten: 0.05-0.5 M NH₄-Trimethylpyruvat

0.1-1 M L-tert. Leucin

2.7 M NH₄-Formiat

0.5 U/ml FDH-C23S

pH 6-9

T = 40°C

[0047] Die Inkubation erfolgte über 18 Tage. Täglich wurden Proben für den Aktivitätstest entnommen. Die halblogarithmische Auftragung der Restaktivität gegen die Zeit ergaben eine Gerade, deren Steigung die Inaktivierungskonstante k darstellt. Die Halbwertszeit τ der Inaktivierung erhält man aus dem Zusammenhang $\tau = \ln 2 / k$.

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstrasse 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311
- (G) TELEFON: 069-218-01

10

15

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Mutanten der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*, neu Gensequenzen diese codierend sowie Verwendung der neuen Formiatdehydrogenasen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

20

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1095 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

40

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: rec-FDH
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: *Candida boidinii*
- (G) ZELLTYP: Hefe

45

(viii) POSITION IM GENOM:

- (C) EINHEITEN: bp

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..1095

50

55

EP 0 926 240 A2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

5	ATG AAG ATT GTC TTA GTT CTT TAT GAT GCT GGT AAG CAC GCT GCT GAT Met Lys Ile Val Leu Val Leu Tyr Asp Ala Gly Lys His Ala Ala Asp	48
	1 5 10 15	
10	GAA GAA AAA TTA TAT GGT TGT ACT GAA AAT AAA TTA GGT ATT GCC AAT Glu Glu Lys Leu Tyr Gly Cys Thr Glu Asn Lys Leu Gly Ile Ala Asn	96
	20 25 30	
15	TGG TTA AAA GAT CAA GGT CAT GAA CTA ATT ACT ACT TCT GAT AAA GAA Trp Leu Lys Asp Gln Gly His Glu Leu Ile Thr Thr Ser Asp Lys Glu	144
	35 40 45	
20	GGT GAA ACA AGC GAA TTG GAT AAA CAT ATC CCA GAT GCT GAT ATT ATC Gly Glu Thr Ser Glu Leu Asp Lys His Ile Pro Asp Ala Asp Ile Ile	192
	50 55 60	
25	ATC ACC ACT CCT TTC CAT CCT GCT TAT ATC ACT AAG GAA AGA CTT GAC Ile Thr Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Ile Thr Lys Glu Arg Leu Asp	240
	65 70 75 80	
30	AAG GCT AAG AAC TTA AAA TTA GTC GTT GTC GCT GGT GTT GGT TCT GAT Lys Ala Lys Asn Leu Lys Leu Val Val Val Ala Gly Val Gly Ser Asp	288
	85 90 95	
35	CAC ATT GAT TTA GAT TAT ATT AAT CAA ACA GGT AAG AAA ATC TCA GTC His Ile Asp Leu Asp Tyr Ile Asn Gln Thr Gly Lys Lys Ile Ser Val	336
	100 105 110	
40	CTG GAA GTT ACA GGT TCT AAT GTT GTC TCT GTT GCT GAA CAC GTT GTC Leu Glu Val Thr Gly Ser Asn Val Val Ser Val Ala Glu His Val Val	384
	115 120 125	
45	ATG ACC ATG CTT GTC TTG GTT AGA AAT TTC GTT CCA GCA CAT GAA CAA Met Thr Met Leu Val Leu Val Arg Asn Phe Val Pro Ala His Glu Gln	432
	130 135 140	
50	ATT ATT AAC CAC GAT TGG GAG GTT GCT GCT ATC GCT AAG GAT GCT TAC Ile Ile Asn His Asp Trp Glu Val Ala Ala Ile Ala Lys Asp Ala Tyr	480
	145 150 155 160	
55	GAT ATC GAA GGT AAA ACT ATC GCT ACC ATT GGT GCT GGT AGA ATT GGT Asp Ile Glu Gly Lys Thr Ile Ala Thr Ile Gly Ala Gly Arg Ile Gly	528
	165 170 175	
60	TAC AGA GTC TTG GAA AGA TTA CTC CCA TTT AAT CCA AAA GAA TTA TTA Tyr Arg Val Leu Glu Arg Leu Leu Pro Phe Asn Pro Lys Glu Leu Leu	576
	180 185 190	
65	TAC TAC GAT TAT CAA GCT TTA CCA AAA GAA GCT GAA GAA AAA GTT GGT Tyr Tyr Asp Tyr Gln Ala Leu Pro Lys Glu Ala Glu Glu Lys Val Gly	624
	195 200 205	

5	GCT AGA AGA GTT GAA AAT ATT GAA GAA TTA GTT GCT CAA GCT GAT ATC Ala Arg Arg Val Glu Asn Ile Glu Glu Leu Val Ala Gln Ala Asp Ile 210 215 220	672
10	GTT ACA GTT AAT GCT CCA TTA CAC GCA GGT ACA AAA GGT TTA ATT AAT Val Thr Val Asn Ala Pro Leu His Ala Gly Thr Lys Gly Leu Ile Asn 225 230 235 240	720
15	AAG GAA TTA TTA TCT AAA TTT AAA AAA GGT GCT TGG TTA GTC AAT ACC Lys Glu Leu Leu Ser Lys Phe Lys Lys Gly Ala Trp Leu Val Asn Thr 245 250 255	768
20	GCA AGA GGT GCT ATT TGT GTT GCT GAA GAT GTT GCA GCA GCT TTA GAA Ala Arg Gly Ala Ile Cys Val Ala Glu Asp Val Ala Ala Ala Leu Glu 260 265 270	816
25	TCT GGT CAA TTA AGA GGT TAC GGT GGT GAT GTT TGG TTC CCA CAA CCA Ser Gly Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro 275 280 285	864
30	GCT CCA AAG GAT CAC CCA TGG AGA GAT ATG AGA AAT AAA TAT GGT GCT Ala Pro Lys Asp His Pro Trp Arg Asp Met Arg Asn Lys Tyr Gly Ala 290 295 300	912
35	GGT AAT GCC ATG ACT CCT CAC TAC TCT GGT ACT ACT TTA GAC GCT CAA Gly Asn Ala Met Thr Pro His Tyr Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ala Gln 305 310 315 320	960
40	ACA AGA TAC GCT GAA GGT ACT AAA AAT ATT TTG GAA TCA TTC TTT ACC Thr Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Glu Ser Phe Phe Thr 325 330 335	1008
45	GGT AAA TTT GAT TAC AGA CCA CAA GAT ATT ATC TTA TTA AAT GGG GAA Gly Lys Phe Asp Tyr Arg Pro Gln Asp Ile Ile Leu Leu Asn Gly Glu 340 345 350	1056
50	TAC GTT ACT AAA GCT TAC GGT AAA CAC GAT AAG AAA TAG Tyr Val Thr Lys Ala Tyr Gly Lys His Asp Lys Lys * 355 360 365	1095

Patentansprüche

1. Gegenüber der rec-FDH und dem Wildtypenzym aggregations- und oxidationsunempfindlichere Mutanten der rec-FDH aus *Candida boidinii*,
dadurch gekennzeichnet,
daß man schwefelhaltige Aminosäuren der rec-FDH durch gerichtete Mutagenese unabhängig voneinander, einzeln oder zusammen gegen nicht schwefelhaltige Aminosäuren austauscht.
2. Mutanten nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man an den Positionen 23 und 262 die Aminosäuren Cystein unabhängig voneinander, einzeln oder zusammen gegen Serin, Alanin oder Valin eintauscht.

3. Neue Gene, die neuen Mutanten nach Anspruch 2 codierend.
4. Verwendung der Mutanten nach Anspruch 1 in einem Verfahren zur Herstellung chiraler Verbindungen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Abb. 1: Vektorkarte des Expressionsplasmids pBTac-FDH

